

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift

(11) DE 32 18 121 A1

(51) Int. Cl. 3:

A61K 45/08

A 61 K 45/02

A 61 K 45/05

A 61 K 39/44

A 61 K 39/385

A 61 K 35/56

A 61 K 37/54

A 61 K 31/70

A 61 K 39/04

A 61 K 35/56

(71) Anmelder:

Leskovar, Peter, Dr.-Ing., 8000 München, DE

(72) Erfinder:

Antrag auf Nichtnennung

(54) Arzneimittel zur Tumorbehandlung

Die Erfindung betrifft intravasal zu verabreichende Arzneimittel zur Behandlung von Tumorerkrankungen, die einen Gehalt an in Liposomen und/oder Erythrozyten enkapsulierten Immunstimulanten oder Cytotoxika aufweisen. (32 18 121)

DE 32 18 121 A1

DE 32 18 121 A1

Arzneimittel zur Tumorbehandlung.**Patentansprüche.**

1. Arzneimittel zu verabreichende Arzneimittel zur Tumorbehandlung, gekennzeichnet durch einen Gehalt an in Liposomen und/oder Erythrozyten enkapsulierten Immunstimulatia oder Cytotoxica.
2. Arzneimittel nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen Gehalt an in Liposomen und/oder Erythrozyten enkapsulierten, gegebenenfalls einer Membranveränderung unterzogenen Membranfragmenten oder Membranextrakten von Primärtumor- oder Metastasezellen.
3. Arzneimittel nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen Gehalt an enkapsuliertem Interferon, Interferoninducern und/oder anderen an sich bekannten Immunstimulantien.
4. Arzneimittel nach Anspruch 1 - 3, gekennzeichnet durch einen Zusatz von die Antigen-Antikörperreaktion verstärkenden Substanzen,
5. Arzneimittel nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen Gehalt an Peroxydbildnern, Immunotoxinen oder spezifischen Cytostatika, die in Liposomen und/oder Erythrozyten enkapsuliert sind, welche an der Liposomoberfläche monoklonale oder präabsorbierte Heteroantikörper gegen Tumorantigene (TSTA, TATA) tragen.

3218121

- - 2 -

Die Erfindung betrifft Arzneimittel zur Behandlung von
Tumorerkrankungen. Zahlreiche Forschungsarbeiten in

- 2 -

COPY

verschiedenen Ländern beschäftigen sich mit den für die Tumor- und Metastasenveränderung verantwortlichen immunologischen Kontrollmechanismen und haben bereits jetzt viel zum besseren Verständnis beigetragen.

Danach kommt den Makrophagen eine zentrale Bedeutung bei der Erkennung und selektiven Abtötung von Tumorzellen zu. Die überwiegend sessilen Makrophagen gehören zu den Phagozyten, also denjenigen Zellen, die Gewebe trümmer, Fremdkörper, Mikroben und andere Zellen aufnehmen und verdauen, die amöboid beweglichen Makrophagen zeichnen sich durch einen großen spindelförmigen Zellkern mit zahlreichen Vakuolen aus. Es hat sich nun herausgestellt, daß in zwei kritischen Phasen der Tumorentstehung und -entwicklung, nämlich in der kritischen Frühphase der Erstetablierung von spontan oder induziert transformierten Einzelzellen und in der zweiten kritischen Phase der Metastasenbildung nach Dissipation und Ansiedlung der Primärtumorzellen in Sekundärorganen die Aktivierung der für die natürliche Immunabwehr gleichfalls verantwortlichen NK-, NC- und K-Leukozyten nur über aktivierte Makrophagen verläuft bzw. nur in deren Anwesenheit funktioniert. Nach einigen Untersuchungen sollen selbst bei der spezifischen Cytotoxicität der T-Lymphozyten Makrophagen beteiligt sein, dies führt zu einer Erhöhung der Immunogenität durch Umwandlung der Antigene zu sogenannten Superantigenen. Vorbedingung für die unspezifische Tumorizidität der Makrophagen, die genau zwischen transformierten und normalen Zellen in syn-, allo- und gar xenogenen Systemen unterscheiden können und keine Resistenz, die sonst regelmäßig bei Cystostatika und Bestrahlung beobachtet wird, auslösen, ist deren Aktivierung; nicht aktivierte Makrophagen sind ineffektiv. Nach spezifischer oder unspezifischer Stimulierung werden Makrophagen selektiv tumorizid. Diese Eigenschaft ist so ausgeprägt, daß bisher noch keine Tumorzellsubpopulationen beobachtet worden sind, die den aktivierten

COPY

Makrophagen gegenüber Resistenz entwickeln würden, im Gegensatz zu der regelmäßig beobachteten Resistenz einiger weniger Tumorzellclones gegenüber allen Cytostatika und Bestrahlung. Dieser Umstand ist deshalb von besonderer Bedeutung, da man heute weiß, daß jeder Tumor aus einer großen Anzahl von Subpopulationen besteht, die sich im Phänotyp, Karyotyp, Rezeptoranwesenheit, Immunogenität, Antigenstruktur, Metastasenneigung und Ansprechbarkeit auf Cytostatika und Bestrahlung unterscheiden. Durch die Resistenz der Subpopulationen können Tumore später zu Rezidiven führen. Durch die selektive Abtötung der nicht resistenten Tumorzellclones gewinnen die resistenten Tumorzellen sogar einen Selektionsvorteil. Dies wird besonders plausibel, wenn man die Erkenntnisse amerikanisch Forscher ins Auge faßt, wonach Subpopulationen innerhalb des Primärtumors eine große phänotypische Diversität entwickeln, sobald sie aus dem Tumorzusammenhang, wie z.B. bei Versuchen in Form der Monoklonierung mit anschließender Koloniebildung, befreit werden. Die Zellen unterliegen danach im Tumorgewebe einer gegenseitigen Kontrolle. Wie Forschungen in Israel festgestellt haben, kontrolliert der Primärtumor auch die Metastasen, die nach Entfernung des Primärtumors "explodieren" können. Auch im Tierversuch zeigt sich, daß eine niedrige Zahl von Tumorzellen zwar zu kleinerem Tumor führt, die Metastasierung jedoch ausgeprägter sein kann. Da die Aktivierung von NK-Zellen, die in erster Linie für die Verhinderung des Angehens von den ersten transformierten Zellen und später von den disseminierten Tumorzellen in den Prämetastasen verantwortlich gemacht werden, über die Makrophagenaktivierung verläuft, ergibt sich daraus die zentrale Rolle der Makrophagen bei der Bekämpfung von Tumorzellen. Es ist auch bereits bekannt, daß die Makrophagenaktivierung eine direkte Funktion der Immunstimulatorzugänglichkeit

ist, wie am Beispiel der immunpotenzierenden synthetischen Polyanionen oder am Beispiel von bakteriellen Lipopolysachariden gezeigt werden konnte.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die Zugänglichkeit von Immunstimulation oder Cytotoxika zu verbessern. Zur Lösung dieser Aufgabe werden Arzneimittel vorgeschlagen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie einen Gehalt an in Liposomen und/oder Erythrozyten enkapsulierten Immunstimulantien oder Cytotoxika aufweisen, wobei die Transport-Liposomen bzw. -Erythrozyten im Falle der Cytotoxika an der Oberfläche mit assoziierten oder kovalent gebundenen tumorspezifischen Immunglobulinen beladen sein müssen. Die Liposomen sind diskrete Zellpartikel, die im wesentlichen aus Phospholipiden bestehen und in multilamellarer Form vorliegen. Die Liposomen werden in erster Linie durch Makrophagen phagozytiert bei der sogenannten "clearance" der Liposomen aus der Blutbahn. Nach der Phagocytose werden die in den Liposomen enthaltenen Verbindungen über Phagolysosomen in das Cytoplasma internasiliert. Wie man bereits von Untersuchungen mit Liposom-enkapsuliert Muramyl-Dipeptiden oder MAF (makrophagen-aktivierender Faktor) weiß, üben diese immunstimulierenden Substanzen schon in einer Konzentration, die nur 1/500 bis 1/20.000 der Dosierung der gleichen Substanz im liposomfreien System beträgt, auf die Makrophagen eine starke stimulierende Wirkung aus. Die Liposomen lassen sich nach dem in Cancer Research 39, 881 pp 1979 beschriebenen Verfahren mit verschiedenen Verbindungen beladen, wobei im vorliegenden Fall Immunstimulantien oder Cytotoxika angesetzt werden. Anstelle der Liposomen können auch autologe heterologe, gegebenenfalls vorbehandelte Erythrozyten, gut phagocytierbare, inaktivierte Bakterienstämme oder auch homo- oder heterologe Makrophagen, die

COPY

zuvor In-vitro die Immunstimulator-enthaltenden Erythrozyten internalisiert hatten, eingesetzt werden. Auf diese Weise lassen sich die Immunstimulatoren in hoher Konzentration und gezielt an die Zielzellen und die körpereigenen Makrophagen weitergeben.

1. Als tumorspezifische Immunstimulantien eignen sich erfundungsgemäß:

- 1.1. Membranfragmente und/oder Membranextrakte von Metastasenzellen
- 1.2. Membranfragmente und/oder Membranextrakte von in ihrer Oberflächenstruktur gezielt veränderten Primärtumor- und Metastasenzellen wobei die Ausgangstumorzellen mit heterophilen Antikörpern voropsonisiert sein können.

Die gezielte Membran- (Zelloberflächen-) Veränderung kann durch nachfolgende Behandlungsarten verwirklicht werden:

- 1.2.1. Behandlung der Tumorzellen mit Lektinen und Protektinen
 - 1.2.1.1. mit concanavalin A (Con A), welches spezifisch die D-Glucose und L-D-Mannose-Saccharidengruppen an der Zelloberfläche bindet
 - 1.2.1.2. mit WGA (Agglutinin aus Weizenkeimlingen), welches für die endständigen N-Acetyl-D-Glucosamingruppen spezifisch ist
 - 1.2.1.3. mit SBA (Agglutinin aus Sojabohnen), das mit den N-Acetyl-D-Galactosamin-Endgruppen spezifisch reagiert
 - 1.2.1.4. mit dem Agglutinin aus Ricinus communis, welches spezifisch die D-Galactose- und L-Arabinose-Endgruppen bindet.

COPY

Weitere interessante Pflanzenagglutinine sind noch Extrakte aus *Lotus tetragonolobus*, *Phaseolus limensis*, *Dolichos biflorus*, Limabohnen (PHA) *Phytolacca americana*, *Laburnum alpinum*, *Vicia cracca*, *Sophora japonica*, *solanum tuberosum*, *Sambucus nigra*, *Marasmius oreades* u.a.

Auch proteolytisch teilgespaltene Lektine, die ihre Spezifität beibehalten haben, sind interessant, weil sie die Kontaktinhibition restaurieren und die Oberfläche von Tumorzellen immunogener gestalten können. Sehr interessante Gruppe stellen auch die Protektine dar. Zu diesen tierischen Agglutininen gehören Extrakte aus *Helix pomatia*, *Helix hortensis*, *Otala lactea*, *Salmo salar*, *Salmo irideus* etc.

- 1.2.2. Behandlung der Tumorzellen (Primärtumor- und Metastasenzellen) durch Enzyme, die die Oberflächengruppen abspalten
 - 1.2.2.1. mit RDE (-"receptor destroying enzyme", Neuraminidase, sialidase): Abspaltung der endständigen Neuraminsäure-Einheiten
 - 1.2.2.2. mit spez. Glycosidasen (α - und β -Glycosidasen): Abspaltung endständiger Saccharideinheiten
 - 1.2.2.3. mit spez. Glycosaminidasen (Mucopolysaccharidasen): Abspaltung endständiger Glycosamine bzw. Oberflächenmucopolysaccharide
 - 1.2.2.4. mit proteolytischen Enzymen (pronase, Papain u. Trypsin): Abspaltung von Mucoproteiden u. Lipoproteiden der Zelloberfläche
 - 1.2.2.5. evtl. leichte Behandlung mit Elast(in)ase, Collagenase, Phosphatase u. RNase.

COPY

- 1.2.3. Behandlung der Tumorzellen mit Perjodat
- 1.2.4. Vorsichtige Vorbehandlung der Lyophilisierten Tumorzellen durch lipoide Lösungsmittel
- 1.2.5. Behandlung der Tumorzellen mit Iodoacetat oder Iodoacetamid oder N-Äthylmaleimid, die alle mit den Sulfhydryngruppen reagieren
- 1.2.6. Behandlung der Tumorzellen mit Dinitrophenylaminocaproat oder TNBS (2,4,6-Trinitrobenzylsulfonsäure)
- 1.2.7. Behandlung der Tumorzellen mit (DNCB) (Dinitrochlorbenzol) oder DNBB (Dinitrobrombenzol)
- 1.2.8. Behandlung der Tumorzellen mit Formaldehyd-Lösung oder Guanidin/Harnstoff.
Die milde Behandlung der Tumorzellen mit Formalin ist deshalb von besonderem Interesse da, wie bei Diphtherie-Toxoid, die immunologische Spezifität nach der Behandlung der Zellen nicht verloren geht und man von einem weiteren Vorteil profitieren könnte, nämlich der Tatsache, daß Antisera gegen ein mit Formaldehyd behandeltes Protein Kreuzreaktivität mit anderen formaldehydbehandelten Proteinen (Zellen) eingehen, selbst wenn zwischen den nativen Formen der Proteinzenellen keine Kreuzreakтивität besteht. Die letztgenannte Eigenschaft formalinbehandelter Zellproteine dürfte nur ein Sonderfall einer allgemeineren Beobachtung sein, wonach denaturierte Protein sehr oft immunologische Kreuzreakтивität aufweisen. Diese Eigenschaft formalinbehandelter Tumorzell-Oberflächenproteine könnte eine wichtige Rolle bei der angestrebten Durchbrechung der "small-dose"-Paralyse gegenüber Tumor-, speziell Metastasenzellen spielen.

COPY

- 1.2.9. Behandlung der Tumorzellen mit Glutardialdehyd
- 1.2.10. Behandlung der Tumorzellen mit Picrylchlorid
- 1.2.11. Behandlung der Tumorzellen mit einigen Farbstoffen, die mit Proteinen (der Zelloberfläche) stabile Verbindungen eingehen, zum Beispiel:
Coomassie R-250; Amidoschwarz 10B; Nigrosin;
Dibromotrisulfofluorescein; Procion Brilliant Blue RS; Fast Green (F.C.F., Food Green 3);
Xylene Brilliant Cyanine G (Coomassie Brilliant Blue G 250) Red W und FDNB
- 1.2.12. Kovalente Bindung von Proteinen ("flags") und kontrolliert synthetisierten Polypeptiden an Primärtumor- und bevorzugt an Metastasenzell-oberflächenstrukturen zwecks Immunogenitätssteigerung.
Synthetische Polypeptide können linear oder verzweigt sein, z.B. in Form eines Hauptstranges mit Seitenketten. Sie können aus einer einzigen Aminosäureart aufgebaut sein, z.B. als Poly-d,L-Alanin oder Polytyrosin oder auch aus 2 oder 3 verschiedenen Aminosäuren kombiniert. Werden diese Ketten als Haptene an Antigene angehängt, so können sie die Immunogenität des Träger-Antigens günstig oder ungünstig beeinflussen. Poly-d,L-Alanin als Hapten setzt die Immunogenität des Trägers herab. Polytyrosinketten steigern die Immunogenität des Trägerantigens und können sogar Gelatine immunogen machen. Im allgemeinen steigert Verschiedenheit der Aminosäuren eines synthetischen Antigens seine Immunogenität. Wesentliche Anforderungen an ein solches Antigenmolekül sind eine stabile Grundstruktur, eine nicht zu hohe elektrische Ladung und Position der immunogen wichtigen Tyrosine an den exponierten Stellen der Seitenketten.

Die kovalente Bindung von immunogenitätssteigernden Proteinen an die Tumorzelloberfläche kann mit Hilfe der speziell in der Affinitätschromatographie vielfach erprobten Techniken wie EDAC, BrCN, N-Hydroxysuccinimid-Ester und BDB (Bis-diazo-benzidin) erfolgen.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kopplung über hexaazotiertes Pararosanilin.

1.2.13. Die Immunogenität könnte gesteigert und die "low-zone"/"low-zone"/"small-dose" Toleranz durchbrochen werden, wenn Primärtumor- und vorzugsweise Metastasenzellen mit Myelomzellen hybridisiert und Zellmembranfragmente und -extrakte so gebildeter Hybridome als Liposomen-Enkapsulate injiziert werden.

Man weiß von den Versuchen mit den (nicht-enkapsulierten) Interspezies-Hybridomzellen her, daß diese Hybridome nach der Inokulierung zum Unterschied zu den ursprünglichen Tumorzellen nicht angehen, weil sie wegen der homologen oder heterologen Histokompatibilitätsantigene an der Zelloberfläche immunologisch abgestossen werden. Dies ist ein wichtiger Gesichtspunkt bei den Überlegungen zur Durchbrechung der oben erwähnten "low-zone"/"small-dose"-Toleranz also der Paralyse des Immunapparates in 2 kritischen Abschnitten der Tumorentwicklung, in der Frühphase der Etablierung erster transformierter Zellen und in der 2. äußerst kritischen Phase der Etablierung disseminierter Metastasenzellen in Kolonien (Prä mikrometastasen), wodurch ein kurabler Primärtumor zum inkurablen Metastasenbegleiteten Tumor wird. Die Tatsache, daß disseminierte Tumorzellen als gut zugängliche Einzel-

und Mikroaggregate in der Blutbahn der immunologischen Surveillance entgehen können, läßt sich kaum anders als durch die erwähnte "low-zone"/"small-dose"-Paralyse deuten. Ausschlaggebend dürfte hierbei das "shedding" der (Tumor (neo) antigene) (TATA, TSTA) in die Blutbahn sein, d.h. das persistierende, gleichmäßige Ausscheiden von geringen Mengen (schwacher) Immunogene, der labilen und speziell in Form von Immunkomplexen leicht von der Tumorzellmembran ablösbarer Tumorantigene.

Der erfindungsgemäße Vorschlag, durch gezielte Veränderung der Tumorzelloberfläche, sei es durch kontrollierte enzymatische oder chemische Behandlung bzw. kovalente Kopplung von immunogenitätssteigernd Proteinen und synthetischen Polypeptiden, sei es durch Hybridisierung (Interspezies-Zellhybride), die Kreuzreakтивität zu erhöhen und durch diese Xenogenisation "schlafende", inaktive Clones der kleinen Lymphozyten ("memory cells") zur Proliferation und zellvermittelter Zytotoxizität anzuregen, erhält starke Impulse in neuesten Erkenntnissen der Immunogenetik, wonach, wie am Modell des 3-LL-Tumors gezeigt, inkolierte Tumorzellen nur in jenen Mäusestämmen zur Metastasierung befähigt waren, die einen identischen H-2^h-Haplotyp aufwiesen. So geringe Unterschiede wie beispielsweise Differenzen im H-2^k, H-2^d, H-2^a oder H-2^s-Haplotyp des MHC der Mäusestämme reichten aus, um das Angehen der Metastasen zu verhindern.

2. Als unspezifische Immunstimulantien eignen sich erfindungsgemäß Liposom- und Erythrozyten-Enkapsulate von:
 - 2.1. Interferon (z.B. Recombinant Interferon A, generell: fibroepithelles leukozitäres und immuninduziertes, d.h. durch Antigen- und/oder

Mitogen-Kontakt induziertes Interferon)

2.2. Interferon-Inducers

2.2.1. Polyribonucleotide (stabilisiert mit CM-Zellulose und Polylysin)

2.2.1.1. Einstranghomopolymere poly rI.

2.2.1.2. Doppelstranghomopolymere poly rI:rC
poly rA:rU

2.2.1.3. Alternierende Copolymeren: poly rI:rC/poly rA:rU

2.2.1.4 Homopolymer-Copolymeren: poly rI:poly rC:rG

2.2.2. Polydesoxyribonucleotide (stabilisiert m.
CN-Zellulose und Polylysin)

2.2.2.1 Homopolymeren poly dA:dT

2.2.2.2 Polydesoxyribonucleotid-Analoge poly sI:sC
(Thiophosphat an Stelle
von Phosphat

2.2.3. Polyribonucleotid-Aggregate poly rI:rC/DEAE-
Dextran

poly rI:rC/poly-L-
Lysin

(Die Bindung an poly-
L-Lysin erhöht die
Stabilität)

2.2.4. Niedermolekulare Interferon-Inducers

Tilorone (Bis-diäthylamino-äthylfluoren),
kationische Farbstoffe wie Acridin und Quinacrin,
Propan-diamin, Mercaptoalkylamine, BL-20803,
MA-56, AET, U-25/166, PMA (=Phorbol-Myristat-Aacetat),
Cimetidine.

2.2.5. Andere Immunostimulatoren, die z.T. über Interferon-
Induktion der Immunabwehr steigern, sind

2.2.5.1 Bakterien und ihre Extrakte (Lipopolysaccharide,
Lipid A, Endotoxine, Toxide)
BCG, Brucella abortus, Brucella melitensis,
Corynebacterium parvum, Haemophilus influenzae,
Klebsiella aerogenes, Listeria monocytogenes u.a.

2.2.5.2. Lektine und Protektine, z.T. proteolytisch vorgespalten Concanavalin A, WGA, SBA, PHA, PNA, Phytohämagglutinine (Lektine) aus Phaseolus limensis, Lotus tetragonolobus, Dolichos biflorus, Phytolacca americana etc. sowie Protaktine aus Helix hortensis, Helix pomatia, Otala lactea, Salmo salar, Salmo irideus etc.

Von besonderem Vorteil sind Kombinationen von 2.2.3.1. und 2.2.3.2. z.B. von BCG und Con A sowie von 2.2.3.2. und Neuraminidasevorbehandelten 2.2.3.1. z.B. PNA (=peanut agglutinin) und Neuraminidasevorbehandelten BCG. Der Effekt kann durch gleichzeitige Injizierung von unveränderten oder in ihrer Oberflächenstruktur gezielt veränderten (Primärtumor- oder Metastasen-) Zellen noch verstärkt werden. Interessant sind auch basische Polymere (Polylsin, Protaminsulfat). An Stelle von BCG kann der Methanol-Extrakt aus BCG (MER) oder die gereinigte aktive Substanz aus BCG (MDP, Muramyl-Dipeptid) verwendet werden.

2.2.5.3. Pflanzenextrakte Lentinan und Pachymaran bzw. Carboxymethyl-Pachymaran

2.2.5.4. KLH (Keyhole-limpet-hemocyanin, Leatil, Levamisol, Zymosan, TNP-KLH (Trinitrophenyl-Keyhole-limpet-hemocyanin)

2.2.5.5. Statolon, Pyran-copolymere (Maleinsäure-Divinyläther-Copolymere), COAM (n.Claes), Levan, Triton WR 1339

2.2.5.6. Thymus-Hormon (Thymus-Extrakt)

2.2.5.7. 13-cis-Retinoid, wasserlösliche Selen-Verbindungen (z.B. Na-Selenit) und Li-Salze

- 2.2.5.8. Oxazolone (ein T-Zell-Stimulator)
2.2.5.9. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, BeSO_4 , Vit.A/Bentonit
2.2.5.10. Hiu I u. II, Wax C, US-behandelte Bakterien

3. Zur direkten oder indirekten Unterstützung der aktiven Phagoxytose empfiehlt sich erfindungsgemäß die Liposom-Enkapsulierung von:
- 3.1. Prostaglandin-Inhibitoren (Indomethaxin, Aspirin)
3.2. Inhibitoren der Enzyme Superoxid-Dismutase und Katalase.
- Eine ähnliche Wirkung könnte der lokale Entzug von Ascorbinsäure, Glutathion und Vitamin E als Elektronen-Akzeptoren haben.
- Vorteilhaft ist die Enkapsulierung von Peroxydase, weiterhin von Peroxid (Persulfat=Persulfat=Peroxodisulfat, Hypohalid), allein oder mit Halid kombiniert, sowie von Katalase-Inhibitor Aminotriazol, mit dem Ziele, den vom Makrophagen ausgehenden tumoriziden Effekt über H_2O_2 zu unterstützen bzw. zu verstärken. Interessant in dieser Beziehung sind neueste Forschungsergebnisse, nach denen das H_2O_2 reduzierende und hiermit inaktivierende Glutathion die Tumorzelle vor Zellyse durch den Makrophagen schützt und durch Unterbindung der Glutathionnachbildung mittels BCNU-vermittelter spezifischer Hemmung des beteiligten Enzyms Glutathion-Reduktase dieser protektive Effekt rückgängig gemacht werden kann.
- 3.3. Dibutyryl-CAMP, Ionophor A 23 187 und Mitogene (allgemein), die über die Regulierung des intrazellulären Ca^{2+} die Lymphozytenproliferation stimulieren.
- Da die Mitogen-stimulierte Lymphozytentransformation, die die eigentliche Mobilisierung der kleinen Lymphozyten ("memory cells") einleitet,

nur in Anwesenheit von (extrazellulären) Ca^{++} -Ionen erfolgen kann und die Mitogene de Ca^{++} -Influx in die Lymphozyten induzieren, und da dieser Ca^{++} -Influx durch Dibutyryl-cGMP beschleunigt (und durch Dibutyryl-cAMP inhibiert) wird, ist eine Liposom-Enkapsulierung von Dibutyryl-cGMP als eine der Möglichkeiten zur Anregung der Lymphozyten zur Proliferation in Betracht zu ziehen. Eine weitere Möglichkeit ergibt sich durch die Enkapsulierung von Ionophor A 23187, welches die Lymphozytenproliferation fördert.

Da nach den modernen Theorien die Phagozytose, Exozytose und die Lysosom-Phagosom-Fusion durch die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration überwacht werden, indem die membranvermittelten Signale über Ca^{++} -Influx bzw. Mobilisierung intrazellulärer Ca^{++} -Depots den basalen Ca^{++} -Spiegel kurzzeitig von 10^{-7}M auf 10^{-5} - 10^{-6}M anheben und hierdurch das Funktionieren des intrazellulären Actin/Myosin-Mechanismus im Mikrofilament- und Mikrotubulus-System (Cytoskeleton) ermöglichen, kann ein Transport von Ca^{++} -Ionen (z.B. als CaCl_2 , in Liposomen enkapsuliert) durch die Zellmembran unter Umgehung der Membranionensperre zur Makrophagenstimulierung führen, wobei durch die Wahl einer günstigen Ca^{++} -Depotform der Effekt protrahiert werden kann. Die Wirkung des oben erwähnten Ionophors A23187 dürfte auf die Mobilisierung des intrazellulären Ca^{++} -Depots zurückgehen; interessanterweise können bereits extrem niedrige Konzentrationen des erwähnten Ionophors (10^{-9}) die Zelle (z.B. den Makrophagen) weitgehend unabhängig von extrazellulären Ca^{++} und Mg^{++} machen.

Da Substanzen mit Affinität für hydrophobe Regionen der Makrophagenmembran dieselbe permeabler für

COPY

(zweiwertige) Ionen machen, kann es von Vorteil sein, die Liposom-Oberfläche mit Proteinen, reich an nicht-polaren Seitenketten oder solchen, die durch spezielle Formen der Denaturierung stark hydrophoben Charakter erhalten haben, zu beladen.

- 3.4. Da bei Tumorgression niedrige und bei Tumorregression hohe CAMP-Spiegel gefunden wurden und da man eine CAMP-CGMP-Regulierung der Zellproliferation annimmt, kann eine lokale (intrazelluläre) Stimulierung der Adenylcyclase einen tumorhemmenden Effekt haben, daher Liposom-Enkapsulierung von Theophyllin, Caffein, Catecholaminen (incl. Epinephrin, Norepinephrin und Isoproterenol) und anderen cAMP-Stimulatoren (die erstgenannten zwei Methylxanthine erhöhen den cAMP-Spiegel über die Phosphodiesterase-Hemmung, die Catecholamine dagegen über die Adenyl-Cyclase-Stimulierung, oder direkte cAMP-Enkapsulierung).
- 3.5. Liposom-Enkapsulierung von Thioglykollat (Makrophagen-Aktivator).
4. Erfindungsgemäße Stimulierung der Liposom-Phagozytose ("Liposom-Clearance") bzw. der Liposom-Membran-Fusion durch:
- 4.1. Polyäthylenglykol (PÄG=PEG)
 PEG verstärkt die Ag/Ak(Antigen/Antikörper) - Reaktion. Dieser Umstand ist insbesondere deshalb interessant, da das PEG (in einer rel. hohen Konzentration von 40%) bei der Zellfusion (Zellhybridierung) nach Köhler und Milstein eingesetzt wird. Mit PEG kombinierte Liposomen können zu einer erleichterten Phagozytose und hiermit Internalisierung des Liposomen-gehalts in phagozytierenden Zellen Anlaß geben. Die optimale Konzentration und Polymerisationsgrad (Molgewicht)

des PEG müßten empirisch herausgefunden werden (Orientierungswert: 4%-ige PEG-Lösung, MG 6000). Eine 4%-ige PEG-Lösung beschleunigt wesentlich die Ag/Ak-Reaktion und verkürzt die benötigte Inkubationsdauer.

Eine 12,5%-ige PEG-Lösung präzipitiert selektiv die an Antikörper gebundenen kurzkettigen Proteine und Peptide bei homogener ("soluble-phase") RIA.

- 4.2 Polyvinylpyrrolidon
- 4.3. Polyvinylalkohol
- 4.4. Polyvinylacetat
- 4.5. Hydroxyäthylstärke
- 4.6. Dextran, Dextransulfat, Polysucrose,
Dextran (poly) phosphat und Phtalsäure-Ester
Dextran (z.B. als 4%-ige Lösung) und Polysucrose (z.B. als 1/4%-ige Lösung) erhöhen die Rosettenbildung (Bindung von SRBC und T-Lymphozyten); es werden auch bei minimaler SRBC-Beladung (Opsonisierung) mit Immunglobulinen Rosetten gebildet und die Empfänglichkeit gesteigert.
Von der hämatologisch-immunologischen Arbeit her kennt man die gute Verträglichkeit der unter 3.6. aufgeführten Substanzen.
Bekanntlich wird Dextrans zur Leukozytensedimentierung und als Blutexpander verwendet.
Phtalsäure-Ester werden zur Gradientenzentrifugation der Zellen verwendet.
- 4.7. Geringer Zusatz (bei lokaler Anwendung) von Ammonsulfat
Ammonsulfat erleichtert den Ag/Ak-Kontakt
- 4.8. Cholesterol
Das freie und das (an der C₃-Hydroxylgruppe) veresterte Cholesterol können einen wichtigen

Einfluß auf die Inkorporation von Liposomen ausüben. Es sollte in Multilamellarvesikeln integriert werden (Cholesterol-haltige Liposomvesikeln). Interessant wäre seine Wirkung auf Fusion und Phagozytose unterschiedlich aufgebauter Liposome in Anwesenheit auch von PEG oder DMSO/Glycerin/Glycerin-monooleat.

Die Komplement-Bindung bei der Cytolyse durch T-Lymphozyten erfolgt nur, wenn der Membrangehalt an freiem Cholesterol 35 Molprozente überschreitet, während die Antikörper-Bindung unabhängig vom Cholesterolgehalt der Zemmmembran erfolgt.

4.9. AET: Auch AET erhöht die Empfindlichkeit der Ag/Ak-Reaktion und kann mit Liposomen kombiniert, die Phagozytose und Internalisierung des Liposom-enkapsulierten Materials beschleunigen.

4.10. Geringer Zusatz von Ag/Ak-Kontakt erhöhenden Substanzen.

Aus der Immunchemie stammt die Erfahrung, daß die Ag/Ak-Reaktion (Präzipitat-Linie, Halo-Linie durch Formaldehyd (10%ige Lösung), Tannin (1%-ige Lösung), β -Naphtoquinon-4-sulfonat u. Ninhydrin (je 1%ig) intensiviert wird.

4.11. Geringer Zusatz von Zellmembranpermeabilität steigender Substanzen DMSO und Glycerin erhöhen die Zellmembranpermeabilität. Beide sind gute kryoprotektive Mittel.

Eigene
kryobiologische Untersuchungen haben gezeigt, daß auch das oben besprochene PEG ausgezeichnete kryoprotektive Eigenschaften besitzt.

4.12. Geringer Zusatz von semipolaren Verbindungen (Acetamid, Formamid).

Wegen des halbpolaren Charakters, der zwischen lipophoben und lipophilen Bereichen vermitteln kann,

sind. Acetamid und Formamid im Zusammenhang mit der Liposom-Forschung von Interesse.

4.13. Geringer Zusatz von (a) kationischen (b) anionischen und (c) nichtionischen Tensiden.

Spuren von Tensiden (oberflächenaktiven Substanzen) sind wegen ihrer starken Beeinflussung der Zellmembran und ihrer Rigidität von zentralem Interesse bei dem Studium der Liposom-Zellmembran-Interaktion.

Besonders interessant sind dabei Verbindungen, bei denen basische Gruppen mit langen aliphatischen Ketten (mit 12 oder mehr C-Atomen) kombiniert sind, da immunologische Untersuchungen gezeigt haben, daß Verbindungen diesen Typs wie quaternäre Ammoniumverbindungen, substituierte Guanidine und Benzamidine eine klare adjuvante Wirkung aufweisen. Dieser Adjuvanseffekt wird mit der Fähigkeit in Zusammenhang gebracht, Zellmembranen aktiv zu beeinflussen. Tatsächlich weiß man von vielen Adjuvantien, daß sie in der Lage sind, Lysosomen in amöboiden Makrophagen aufzulösen wie von Saponin, Vitamin A, Endotoxin.

4.13.1 Beispiele kationischer oberflächenaktiver Substanzen sind Benzylidimethyl-alkylammoniumchlorid (Hyamine 3500, Benzalkoniumchlorid); Benzyl-diisobutylphenoxyäthoxydimethyl-Ammoniumchlorid (Benzethoniumchlorid, Hyamine 1622, Phemerol); Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, Hexadecyl-trimethylammoniumbromid); N-Benzyl-N, N-dimethyl-N-(4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenoxyäthyl)-ammoniumchlorid; N-Benzyl-N, N-dimethyl-N-(4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-tolyloxyäthoxyäthyl)-ammoniumchlorid

- 4.13.2 Beispiele anionischer oberflächenaktiver Substanzen sind Butan-1-sulfonsäure-Na-Salz; Dodecan-1-sulfonsäure-Na-Salz; Hexadecan-1-sulfonsäure-Na-Salz; Octadecan-1-sulfonsäure-Na-Salz; Tetradecan-1-sulfonsäure-Na-Salz; Schwefelsäuredecylester-Na-Salz; Schwefelsäureoctylester-Na-Salz; Schwefelsäureoctadecylester-Na-Salz
- 4.13.3. Beispiele teil- oder nichtionischer oberflächenaktiver Substanzen: Nonylphenolpolyäthenglycoläther; Tetrapropylbenzolsulfonsäuremethylester; Octylphenolpolyäthenglycoläther; Polyäthenglycolmonolauryläther; Polyäthenglykolmonostearyläther; Polyäthenglykolmonostearat.
Besonders interessant ist beim Liposom-Studium der kombinierte Zusatz von PEG und Polyäthenglycolmonolauryläther (bzw. PEG und sein Monostearyläther oder PEG und sein Derivat Monostearat), d.h. die Kombinierung der Liposom-Phospholipide mit PEG und den aus PEG abgeleiteten nichtionischen Tensiden. Tenside könnten mit Formamid und/oder Acetamid kombiniert werden.
- 4.14. Liposom-Enkapsulierung bzw. Phosphatid (Phospholipid) beimischung zum System Mineralöl-Emulgierungsmittel Mannitol-Oleat oder Lanolin) im inkompletten oder kompletten (d.h. mit abgetöteten Mykobakterien versehenen) Freunds Adjuvans könnte den Adjuvans-effekt während der Makrophagensensibilisierung erhöhen. Auch hier können PEG,AET,Tenside, speziell kationische und nichtionische in geringsten Dosierungen weitere Vorteile mit sich bringen. Von besonderem Interesse sind auch quaternäre (Ammonium)basen , da sie schon allein als Adjuvantien wirken können.

- 4.15 Liposom-Enkapsulierung bzw. Adsorption an kolloidale Suspension von Aluminiumhydroxyd oder Aluminiumphosphat oder Bentonit/Montmorillonit, in Kombination auch mit PEG, AET, Tensiden, Mineralöl/Emulgator usw. sind ebenso von Vorteil.
5. Erfindungsgemäße Weiterentwicklung von multilamellären Liposom-Vesikeln
- 5.1. Bei der Weiterentwicklung der Liposomen zwecks Erhöhung der Interaktion Liposom-Zellmembran und Erleichterung der Internalisierung des Liposominhaltes kommen auch Kombinationen der obenerwähnten Phosphoglyceride mit weiteren Verbindungen in Betracht wie Phosphatidyläthanolamin (Cephalin), Phosphatidylinositol, Diphosphatidyglycerol (Cardiolipin), Sphingosin (4-Sphingosin(4-Singenin), Dihydrosphingosin (Sphinganin), Phytosphingosin (4-Hydroxysphinganin), 4,8-Sphingadien, Sphingomyelin, Cerebrosid (Gluccocerebroside, Galactocerebroside und sein Sulfatester, das Sulfatid, Di-, Tri und Tetrahexosid, saurem Glycosphingolipid (Gangliosid) u.a. Neben dem erwähnten Lysolecithin (Lysophosphatidylcholin) können noch andere Lysophosphoglyceride (z.B. Lysophosphatidylethanolamin oder Lysophosphatidylserin) sowie synthetische Produkte, die LPA, d.h. die Lysophospholipid-Analoga, wie 1-Octadecyl-glycero-3-phosphocholin, 1-Octadecyl-2-methyl-glycero-3-phosphocholin, 1-Stearyl-2-methyl-glycero-3-phosphocholin, Hexadecylphosphorylcholin und 1-Dodecylpropandiol-3-phosphocholin bzw. die entsprechenden Derivate (Analoga) des Lysophosphatidylserins, des Lysophosphatidyläthanolamins und des Lysophosphatidylinositols eingesetzt werden. Gegebenenfalls können diese Verbindungen auch in Kombination mit Gallensäuren, ("Chylomicron"-Effekt") sowie mit immobilisierten Lektinen oder Protektinen, (z.B. ConA/Sepharose) Verwendung finden.

6. Tumorselektive Chemotherapie durch Enkapsulierung von cytotoxischen Substanzen in Liposomen und Erythrozyten, die an der Oberfläche mit tumorspezifischen Immunglobulinen (in kovalenter Bindung) beladen sind.

Neben der Stimulierung der körpereigenen Immunabwehr durch bestimmte in Liposomen enkapsulierte Substanzen ergibt sich aber auch die Möglichkeit, die Liposomen zum Transport cytotoxischer Substanzen (an die Tumorzielzelle), allein oder in Kombination mit Immunstimulantien, einzusetzen, um eine selektive Abtötung der transformierten Zellen bei weitgehender Verschonung von gesunden Gewebezellen zu erzielen, wobei die Liposomen an der Oberfläche mit tumorspezifischen Immunglobulinen beladen sein müssen.

Durch Bindung starker Toxine wie Rizin, Abrin, Modeccin, Gelonin, Diphterie-Toxin etc an die F(ab)₂-Fragmente von Immunglobulinen ist es möglich Chimären, sog. "Immunotoxine" zu synthetisieren, die die Zielzellen, z.B. die Tumorzellen, "aufzusuchen" und selektiv abtöten. Folgende dieser Immunotoxine hat man schon im Tierexperiment oder in der Gewebekultur erfolgreich getestet:

Monoklonales IgM-Fragment gegen das Thy 1,2-Antigen, kombiniert mit Rizin A; monoklonale Antikörperfragmente gegen ein kolorektales Tumorantigen, kombiniert mit Rizin A; antiidiotypische Antikörper gegen Immunglobuline eines B-Zell-Lymphoms, kombiniert mit Rizin A; IgG(F)ab)₂-Antiserum gegen L 1210 Leukemiezellen, kombiniert mit Diphterie-A-Fragment und F(ab)₂-Antilymphozyten-Globulin, kombiniert mit Diphterictoxin A. Mit Abrin, konjugiert mit Anti-Thyl.1-F(ab)₂, konnte Lymphom der AKR-Mäuse erfolgreich geheilt werden.

Auch Vinblastin, Daunomycin, ADR, Actinomycin D, Methothrexat, 1- β -D-Arabinofuranosylcytosin u.a. wurden als Liposom-Enkapsulate getestet und brachten Vorteile gegenüber der klassischen Verabreichungsform.

- 6.1. Enkapsulierung von Cytotoxika/Cytostatika.
 Erfindungsgemäß können die bei "Immunotoxinen" aufgeführten Toxine sowie die bisher in Verbindung mit Liposomen nicht beschriebenen Zytostatika der allgemeinen Klassen Alkylantien (Busulfan=Myleran, Chlorambucil-Leukeran, Cyclophosphamid=Endoxan=Cytoxan, DBM=Myelobromal, HN2=Mustargen, Phenylalanin-Mustard, ThioTEPA=TSPA, TEM), Antimetabolite (Azacytidin, Cytosin-arabinosid=Ara-C=Cytosar, 5-FU=5-Fluorouracil, 6-Mercaptourin=6-MP=Purinethol, TTG=Thioguanin), Mitose-Inhibitoren(Vincristin-sulfat) Antibiotika (Mitomycin C, Bleomycin, VP-16) sowie andere Zytostatika (BCNU, CCNU, cis-Platinum (II), Hydroxyurea, DTIC, Mitotan= α , β -DDD und Stathmokinetika (Colcemide, Anguidin) als Liposom - und/oder Erythrozyt Enkapsulate eine tumorselektive Chemotherapie mit minimalen Nebenwirkungen ermöglichen.
- 6.2. Kovalente Bindung der Liposome an HPD
 Das HPD(=Haematoporphyrin-Derivat) wird laut neuester amerikan. Literatur selektiv an Tumorgewebe gebunden. Man kann daher die Liposomen (an Stelle der Ig) an HPD assoziieren bzw. kovalent binden und als Transportmittel für Zytostatika und Toxine anwenden.
- 6.3. Kovalente Bindung der Liposome an Hormone (bei hormonabhängigen Tumoren)
 Bei hormonabhängigen Tumoren wie Prostata- und Mamma-Tumoren ist eine kovalente Bindung (Konjugierung) von Liposom-Vesikeln an synthetische bzw. halbsynthetische Hormone möglich, da die Hormonrezeptoren die Organselektivität ermöglichen.

COPY

6.4. Kovalente Bindung er Liposome an Tumormarker

Interessant ist auch eine Konjugierung von Liposom-Vesikeln an CEA, AFP und Tennessee-Antigen, wenn diese Tumorantigene durch Anreicherung und Reinigung z.B. mit Hilfe von HPLC, präparativer Elektrofokussierung, Affinitätschromatographie oder Chromatofokussierung zur Verfügung stehen.

6.5. Tumorzellproliferationsbeeinflussende Substanzen

Von Interesse sind, bei direkter oder indirekter über Liposom-Transportvesikeln Applikation, Substanzen wie Auxine, indolsubstituierte Carbonsäuren (Indolyl-3-buttersäure), naphtyl- bzw. phenylsubstituierte Essigsäuren (1-Naphtylessigsäure); Derivate von Phenoxykarbonsäuren (2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure; 2,4,5-Trichlorphenoxy-essigsäure; 2-Methyl-4-chlorphenoxy-essigsäure) und Derivate der Naphtoxycarbonsäuren (2-Naphtoxy-essigsäure) wegen der Beeinflussung der Tumorzellproliferation.

6.6. Cytochalasin

An Antitumor-Ig kovalent gebundene Liposomen können auch Träger von Cytochalasin sein, welches Störung der Kern-Cytoplasma-Interaktion in der Tumorzelle verursacht.

6.7. Spezifische Inhibitoren von Collagenase III und IV

Nach den allerneuesten Erkenntnissen amerikanischer Forscher sind Collagenase III und IV (als Exoenzyme) das Merkmal, der Selektionsvorteil, der die metastasierenden Tumorzelllinien von den nicht-metastasierenden Subpopulationen

unterscheidet. Eine Enkapsulierung von spezifischen Collagenase-Hemmern (z.B. von Collagen-Antimetaboliten/Strukturanaloga) in mit Antitumor-Ig beladenen Liposom-Vesikeln ist daher von Interesse.

6.8.

Butyrat

Butyrat induziert als "reverse transformation agent" Wachstumshemmung und/oder morphologische und biochemische Redifferenzierung transformierter Zellen.

Im folgenden wird die Erfindung anhand eines Beispiels näher erläutert.

Beispiel

Phosphatidylcholin (aus Hühnerei) und Phosphatidylserin (aus Rinderhirn) können in chromatographischer Reinheit kommerziell bezogen werden.

Zur Herstellung von multilamellären Vesikeln kann man beide Phospholipide im 1:1- oder im 7:3-molaren Verhältnis in Chloroform auflösen. Vorteilhaft ist eine 4,95:4,95:0,1-molare Mischung von Ei-Phosphatidylcholin, Rinder-Phosphatidylserin und Lysolecithin, gelöst in Chloroform, weil sich

im Versuch gezeigt hatte, daß die dabei entstehenden Liposomen negative Ladung bzw. ein Zeta-Potential aufweisen, welches eine etwa 12fach erhöhte Phagozytose bzw. Membranfusionierung als beispielsweise die elektrisch neutralen Liposomen aus Ei-Phosphatidylcholin zur Folge hat.

Nach der Choroformverdampfung im Rotationsverdampfer werden wasserlösliche Immunostimulatoren im mit 5-10% FCS (FBS=Foetale Kalbserum) versehenen Zellkulturmedium (z.B. RPMI 1640 oder CMEM oder TC 199 oder HBSS) zugesetzt, die Mischung mit einem hochtourigen Gerät 20-60 min lang emulgiert und die entstandenen, Testsubstanz enthaltenen Liposomen durch auf Injektionsspritzen aufschraubbaren Milliporefilter filtriert. Die Liposome werden auf einen Totallipidgehalt von ca 1 μ Mol/ml Zellkulturmedium eingestellt und sollten nicht länger als 24 Stunden stehen. Der durchschnittliche Liposomeninhalt soll ca 2-3 μ l/10% pro Mol Phospholipid betragen. Das Liposom-enkapsulierte Material soll den zu stimulierenden Makrophagen in einer Dosierung gegeben werden, daß 100 μ Mol Phospholipid auf 1,10⁵ Makrophagen anfallen. Diese Liposomdosierung entspricht einer absoluten Menge von ca 0,25 μ l des enkapsulierten Materials pro 1,10⁵ Makrophagen.

Während bei der mechanischen Mischung der nach Abdampfen des organischen Lösungsmittels und "Emulgierung" im wässrigen Medium entstehenden Liposomen Vesikeln mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 5-50 μ m entstehen, kann der mittlere Durchmesser durch Ultraschall-Behandlung der "Emulsion" auf 0,05 μ m herabgesetzt werden. Die mechanisch erzeugten Liposomen sind aus konzentrischen Phospholipid-Bilayern multilamellar aufgebaut, wobei der

- 25 -

interlamellare Raum 54-75 Å beträgt. Die durchschnittliche Schichtdicke der Phospholipid-Bilayer beträgt 50 Å. In diese Zwischenräume wird das wasserlösliche Material wie Immunostimulatoren bzw. Cytostatika und Lektine, in die Liposom-Bilayer die lipophilen Verbindungen eingebaut. Bei nicht-molekulardispersen Wirksubstanzen wird dieser regelmäßig konzentrische Aufbau gestört, es kommt viel mehr zu einer Art Beladung der partikulären Effektormaterialien mit multilamellarer Liposomaußenschicht. Die fehlende Antigenität der Liposomaußenschicht verhindert Immunantworten vom verzögerten Typ bei gleichzeitig erleichterter Membranannäherung und Fusion. Durch Ersatz von Dicetylphosphat in einem 7:2:1-Gemisch von Lezithin, Cholesterol und Dicetylphosphat durch Stearylamin kann die negative Oberflächenladung des Liposoms zur positiven umgewandelt werden. Dies ist deshalb von Bedeutung da man beispielsweise von Proteinen, die bei pH 7, 0-7,4 positiv geladen sind, weiß, daß sie wesentlich höhere Immunogenität aufweisen, wenn sie in positiv geladenen Liposomen enkapsuliert werden. Auch das Lezithin: Cholesterol-Verhältnis ist wichtig. Günstig ist oft die Oberflächenbeladung der Liposomvesikeln mit denaturierten Immunglobulinen und (aktivem) C3-Komplement. Günstig ist, wie an^{an} derer Stelle erwähnt, die gleichzeitige Applikation von Adjuvantien wie Saponin, M. tuberculosis, B. pertussis u.a. Bei Liposom-Injizierung entstehen an der Injektionsstelle keine Granulome. Liposomen zeigten bei der Anwendung beim Menschen keinerlei negativen Effekte, eine rapide Mobilisierung von der Injektionsstelle und eine beträchtliche Retentionszeit in der Lymphknoten. Liposomen sind biodegradierbar.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.